

氏 名（本籍）	木 村 和 哉（埼玉県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	乙第414号
学位授与年月日	平成19年11月26日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	医薬品開発における非臨床戦略に関する研究： 薬物誘発QT延長作用による致死性不整脈リスクに対する新たな評価体系の 確立
論文審査委員	（主査） 赤 堀 文 昭 （副査） 政 岡 俊 夫 若 尾 義 人

## 論 文 内 容 の 要 旨

近年、循環器系薬以外の経口薬が心室再分極過程（QT間隔）を延長させ、Torsades de Pointes（TdP）といわれる致死性の心室性不整脈を誘発することが報告されている。通常、循環器系薬はその薬理作用の検討から、心循環器系に関する多くの非臨床研究が行われ、臨床現場の医師はそれらの情報を基に慎重に処方している。一方、循環器系以外の薬物においては、必ずしも心臓が標的臓器ではないことから、これまで循環器系への影響は一般毒性試験や安全性薬理試験の中でのみ検討されてきた。それ故、循環器系以外の候補薬物では心室再分極過程に対する詳細な検討がなされず、薬物のQT延長作用を見落してしまうケースがある。一例ではあるが、消化管運動促進薬の cisapride は、QT 間隔延長を伴う TdP の発生により、多くの患者の命を奪い、結果的に2002年、市場から撤退した。

このような背景から、非循環器系薬物の開発においても、QT間隔延長を伴うTdP発生のリスクを臨床試験前に明らかにし、ヒトへの安全性を担保した上で臨床試験を進めることが期待されている。しかしながら、全ての非循環器系薬物に対して、循環器系薬物と同様に多くの非臨床試験を実施することは、医薬品開発上、非効率的であり、実験動物使用の倫理的側面からも問題がある。そのため、できるだけ少ない動物数で検出力の高い有効なスクリーニング試験としてのリスク評価系が求められるが、その詳細な指針はまだない。だからこそ、ヒトの安全性を担保するための前臨床試験におけるスクリーニング試験系として、QT延長作用及びTdP発生リスクの検出力が高く、再現性のある有用な評価系の確立が求められている。

本研究では、臨床現場においてQT延長作用を示し、かつ、TdPを誘発した薬物として cisapride を、また、同じ消化管運動促進薬で、臨床試験ではTdP発生の報告がない mitemcinal を用い、以下に述べる第1～3章の評価系について両者の比較試験を行った。まず第1章では、TdP発生前に起こるQT間

QT延長を検出する有効かつ感度の高いスクリーニング系として、これまでの研究成果の蓄積から  $I_{kr}$  チャネルアッセイ法及びモルモットにおける心室再分極アッセイ法をバッテリー試験とすることで、有用なスクリーニング試験となり得るかどうか検討した。また、第2章及び3章では、QT延長作用を有する薬物が実際にTdPを誘発するか否かを評価するための試験系（第2章：ウサギ催不整脈モデル、第3章：麻酔犬における活動電位終末相（TRP; Terminal Repolarization Period）の測定）について、その有用性を検証した。そして、第4章では、総合考察として、mitemcinalではQT延長作用が認められるが、TdPは発現しないことについて（第1章～3章）、QT延長作用を引き起こすフリー体濃度とmitemcinalの臨床用量におけるフリー体血中濃度との乖離を算出し、mitemcinalの安全域についてcisaprideのデータと比較した。

このように、本研究はQT延長及びTdP発生に関する感度の高い実験を組み合わせ、医薬品の非臨床試験段階におけるQT延長作用及びTdP発生リスクを正確かつ効率的に評価し得るスクリーニング体系を構築することを目的とした。

## 第1章 $I_{kr}$ チャネル及び *in vivo* 心室再分極アッセイ法によるQT延長評価系の有用性

ヒトにおいて、cisaprideを含めTdPを引き起こす多くの薬物は、心室再分極過程に関与している  $I_{kr}$  チャネルを選択的に阻害することにより再分極遅延を引き起こすことが知られている。それ故、薬物の  $I_{kr}$  チャネルに対する阻害作用を検討することは、その薬物のQT延長リスクを知る上で極めて重要である。しかしながら、再分極時間を決定しているのは、 $I_{kr}$  チャネルだけでなく、 $Na^+$  チャネル及び  $Ca^{2+}$  チャネルも関与している。例えば、 $Ca^{2+}$  チャネルは活動電位の持続層に関与しており、 $Ca^{2+}$  チャネルが不活化された後、再分極過程は終了に向かう。従って、薬物により  $Ca^{2+}$  チャネルが遮断された（ $Ca^{2+}$  チャネルの不活化が早まる）場合、再分極時間は短縮する。そのため、 $Ca^{2+}$  チャネルと同時に  $I_{kr}$  チャネルを阻害する薬物は、結果的に再分極過程を延長させない場合がある。すなわち、hERG (human ether-a-go-related gene、ヒト  $I_{kr}$  チャネル遺伝子) 試験により  $I_{kr}$  チャネルを抑制する薬物が必ずしもQT間隔延長作用を引き起こすとは限らないことから、薬物のQT延長リスクを評価するためには、 $I_{kr}$  チャネルの阻害作用を確認し、かつ、*in vivo* において再分極時間に対する作用を確認する必要がある。本章では、薬物のQT延長作用を検出するための試験系として、 $I_{kr}$  チャネル及び *in vivo* 心室再分極アッセイ法の2つの試験を選択し、その組み合わせによるバッテリー試験としての有用性を検討した。

$I_{kr}$  チャネルアッセイ法としては、hERG試験法を用いた。すなわち、hERGを導入したHEK293 (human embryo kidney、ヒト胎児腎臓) 細胞にパッチクランプを施し、 $I_{kr}$  を介して流れる電流に対する薬物の阻害作用を検討した。一方、*in vivo* 再分極アッセイ法におけるQT延長評価の今日の最大の課題は、心電図QT間隔が心拍数の減少により延長するため、実験により得られたQT間隔延長が薬物によるチャネル阻害なのか、あるいは単に心拍数が減少したものかを明確に区別できる試験系の確立である。また、新薬開発初期において、多くの化合物のQT延長評価では、化合物量に限りがあること

及び動物倫理の観点から、小さな動物によるスクリーニング系の確立が求められる。そこで、先ず、麻酔モルモットを用いて、心拍数の変化によるQT間隔の変動を除去するために心臓にpacingを行い、心拍数を一定(このとき、QT間隔も一定)に保った条件下で行う再分極アッセイ法を確立し、検討した。

その結果、cisaprideは、モルモットにおいて明らかな再分極遅延を引き起こし、前臨床及び臨床試験において報告されているQT延長作用の結果をよく反映していた。このようにモルモットを用いた*in vivo*再分極アッセイ法(pacingによる心拍数を一定とする条件下)の有効性が立証できたことから、次に、hERG試験及びモルモット再分極アッセイの2つの試験を用いて、mitemcinalのQT延長作用を検討した結果、mitemcinalは $I_{Kr}$ チャネルを阻害することにより再分極遅延を引き起こすことが明らかとなった。また、麻酔モルモットの*in vivo*試験において、心拍数を一定にした条件で評価することにより、洞調律時の評価に比べcisapride及びmitemcinalのQT延長作用を精度よく検出することができ、本試験系の有用性を証明した。このように、新薬開発初期におけるQT延長リスク評価では、化合物の使用量及び動物倫理の観点からも、両試験の組み合わせによる評価系は極めて有用性の高いことを立証した。

## 第2章 ハイリスク患者モデルとしての催不整脈モデル動物(ウサギ)の有用性

第1章では、QT延長作用の検出系として、 $I_{Kr}$ チャネルに対するhERG試験及び麻酔モルモットによる再分極アッセイ法のバッテリー評価系が有用であることを究明した。しかし、臨床現場におけるTdPの発生は、薬物の有するQT延長作用の強弱のみならず、患者背景、例えば、性別、血中 $K^+$ 濃度、心拍数のレベル、既往歴(特に心臓疾患)の違いなどにより影響される。従って、第1章のバッテリー試験系においてQT延長作用を示した薬物が、実際にTdPを発生させるかどうかを、薬物のQT延長作用の強弱のみで正確に予測するのは難しい。そこで、ヒトでのTdP発生のリスクを予測するためには、心臓疾患などの既往歴を持つハイリスク患者を想定した催不整脈モデル動物を用いて、実際にTdPを発生させるかどうかを確認する必要がある。本章では、QT延長作用を有することが確認されたcisapride及びmitemcinalを本モデルに適用し、本モデルの有用性を検証した。

本試験で使用したウサギ催不整脈モデルは、外科的に完全房室ブロックを施して作製される慢性房室ブロック犬がモデル作製に4週間以上を要するのに比べ、急性モデルであるが故にスクリーニング処理能力が高く、医薬品開発への応用が期待される。すなわち、この試験法は、ウサギ催不整脈モデルにQT延長作用を有する薬物と共にmethoxamine( $\alpha_1$ 受容体作動薬)を持続的に投与すると、再分極相における心筋細胞内への $Ca^{2+}$ 流入が頻繁に起こり、 $Ca^{2+}$ 流入による刺激が次の心拍のトリガーとなって、容易にTdPを発生させることができる。また、ヒトにおけるTdP発生は心血管系に $\alpha_1$ 受容体が高頻度に発現していることに関連していることを考慮すると、このウサギモデルはヒトにおける薬剤性TdP発生の予測に適したモデル動物といえる。

cisaprideを本モデル動物にmethoxamineと共に静脈内投与すると、明らかなQT延長作用を示し、投与した半数例(6例中3例)にTdPの発生が認められた。一方、mitemcinalとmethoxamineとの投与

では、QT延長作用は cisapride の場合と同程度認められたにも拘らず、TdP は 6 例中、全く観察されなかった。このことは、cisapride がヒトの臨床現場において TdP を引き起こすこと、mitemcinal が臨床試験において TdP 発生が認められていないことを良く反映しており、このモデル動物の有用性を明らかにした。

この研究結果から、TdP 発生の要因が QT 延長作用のみではないことが示唆され、QT 延長作用の有無のみを判断材料としてリスク評価を行ってきた従来のアセスメント法に、TdP 発生リスクの評価を加えることが極めて重要であることを立証した。

### 第3章 麻酔犬における TRP 測定の有用性

ウサギ催不整脈モデルはスクリーニング系として有用であるものの、 $\alpha_1$  受容体の阻害作用を有する薬物では TdP 誘発の感度が低下することが考えられる。そこで、新薬開発において、候補薬物が絞られてきた段階では、比較的大きな動物を用いても、より正確に候補薬物の TdP 発生リスクを予測できる評価系が必要となる。そこで、ハロセン麻酔犬を用いた QT 延長評価において、TdP を引き起こす薬物の多くが再分極過程のうち、TRP の成分を有意に延長させることにより再分極遅延を引き起こす点に注目した。TRP は心室再分極終点と有効不応期の差で表され、TRP の延長は  $\text{Ca}^{2+}$  流入などの外的刺激を受ける確率が増すことから、不整脈の発生する確率を高めると考えられている。本章では、ハロセン麻酔犬を用いて、cisapride 及び mitemcinal の TRP に対する作用を検討し、TRP の延長が TdP 発生の指標として有用であるか否かを検証した。

cisapride の投与により有意な QT 延長作用が認められ、同時に TRP の有意な延長が認められた。一方、mitemcinal の投与では、有意な QT 延長作用が認められたが、TRP の延長は認められなかった。すなわち、本研究において、cisapride では TRP の延長により TdP 発生リスクが増大していることが示されたが、mitemcinal は TRP への影響がないことから TdP 発生リスクを増大させないことが示唆された。この結果は、前述のウサギ催不整脈試験の結果を支持すると共に、両薬物の臨床結果の違いを反映するものであった。

このように、イヌでの TRP の検討は、QT 延長作用を有する薬物の中で、TdP を発生させるものと発生させないものとの差を明らかにすることができ、TRP は TdP 発生のリスクの有用な評価指標であることを確認し、評価体系に加えることの意義を証明した。

### 第4章 総合考察

第1～3章において、薬物の QT 延長作用及び TdP 発生リスクの評価系について検討を行い、これらの試験系は新薬開発のスクリーニングに適した精度の高い試験系であることが示された。本章では、総合考察として、非臨床試験において得られた cisapride 及び mitemcinal の QT 延長作用を引き起こす血中フリー体濃度と両薬物の臨床使用量における血中フリー体濃度との関連を明らかにし、両薬物のヒトの使用におけるリスク評価を行った。

cisapride の臨床用量における血中フリー体濃度は 6.2 nM であることが報告されており、hERG の IC<sub>50</sub> (6.5 ~ 44.5 nM) 及びハロセン麻酔犬において QT 延長作用を示す血中フリー体濃度 (20 nM) との乖離は、それぞれ、わずか 1 ~ 7 倍及び 3 倍であった。一方、mitemcinal の臨床用量での血中フリー体濃度 (1.1 nM) と hERG IC<sub>50</sub> (20,200 nM) 及び *in vivo* 試験における血中フリー体濃度 (モルモット再分極アッセイ; 110 nM、ハロセン麻酔犬における再分極アッセイ; 770 nM) の乖離は、それぞれ、18,000 倍及び 100 ~ 700 倍であった。TdP を発生させる多くの薬物において、非臨床試験で QT 延長作用を示すフリー体濃度と臨床用量におけるフリー体濃度との乖離は 30 倍以内であることが報告されている。今回、mitemcinal の非臨床試験において、最も狭い安全域でも (モルモット再分極アッセイ法での結果)、約 100 倍の乖離があることから、mitemcinal の臨床現場における TdP 発生の可能性は低いと判断できる。現在まで、mitemcinal の臨床試験において、ハイリスク患者を含めた総被験者 647 名の詳細な心電図検査を行った結果、QT 延長及び TdP の発生は認められておらず、新たに構築してきた評価体系によるリスクアセスメントがヒトへの外挿性に優れていることを示している。

このように本研究では、QT 延長作用に関するいくつかの試験系を組み合わせ、医薬品の QT 延長作用及び TdP 発生リスクを正確かつ効率的に評価し得る評価体系を構築することができた。すなわち、hERG 試験及び麻酔モルモットを用いた *in vivo* 再分極アッセイ法は、医薬品開発初期段階の QT 延長作用を評価するスクリーニング試験として、少量の化合物でスクリーニングできる極めて検出力の高いバッテリー試験である。それ故、これらの試験により、薬物の QT 延長作用の有無を明らかにし、QT 延長作用が認められなければヒトの TdP 発生リスクは極めて低いと考えられる。一方、QT 延長作用が認められた場合でも、必ずしもヒトにおいて TdP が発生するとは限らないことから、ウサギ催不整脈モデル動物による TdP 発生の有無、及びハロセン麻酔犬を用いた TRP の測定が重要と考えられる。ウサギ催不整脈モデルは、急性モデルとして開発早期のスクリーニングに有用である一方、イヌを用いた電気生理学的検討は、TRP が的確に TdP の指標となることが立証されたことから、開発候補品の最終確認に有用な手段と考えられる。

本研究で確立した評価体系 (精度の高い、効率の良いバッテリー試験) から得られた結果と、それに基づき予測されたヒトでの QT 延長リスク評価は、両薬物の臨床使用における QT 延長作用の報告と良く一致していた。それだからこそ、この評価体系は、ヒトへの安全性予測において極めて精度の高いことを立証し、創薬段階での有益な医薬品の排除を回避できると共に、使用動物の削減にも繋がると考えられる。加えて、筆者らは本リスクアセスメントを、mitemcinal の米国臨床展開の際、世界に先駆けて米国食品医薬品局 (FDA; Food and Drug Administration) に提案し、国際水準ガイドライン作成に寄与した。

## 論文審査の結果の要旨

医薬品の開発において、これまで循環器系以外の薬物の循環器系への影響は一般毒性試験や安全性

薬理試験のなかで検討されてきた。その結果、時として重篤な心毒性である Torsades de Pointes (TdP) といわれる致死性の心室性不整脈が臨床試験の段階、あるいは市場に出てから認められ、治療薬であるべき薬で、患者が死の転帰をとるケースが発生した。このような背景から、非循環器系薬物の開発においても、TdP 発生リスクを臨床試験前に明らかにできる評価系の確立が望まれてきた。

本研究は臨床現場で QT 延長作用を示し、かつ、TdP を誘発した消化管運動促進薬である cisapride、及び同じ消化管運動促進薬で臨床試験では TdP 発生報告のない mitemincinal を取り上げ、スクリーニング試験として再現性の高い、有用な評価系を確立することを目的とした。

## 第1章 $I_{kr}$ チャンネル及び *in vivo* 心室再分極アッセイ法による QT 延長評価系の有用性

本章では、著者は重篤な副作用である TdP を引き起こす薬物が  $I_{kr}$  チャンネルを阻害することにより QT 延長作用を示すことが知られていることから、先ず開発候補薬物に  $I_{kr}$  チャンネル阻害作用があるか否かを評価することが重要であると考えた（薬物の  $I_{kr}$  チャンネル阻害作用の検出： $I_{kr}$  チャンネルアッセイ法—hERG (human ether-a-go-go-related gene) 試験)。次に、QT 時間（再分極時間）を決定しているのは、 $I_{kr}$  チャンネルだけでなく、 $Na^+$  チャンネルや  $Ca^{2+}$  チャンネルも関与している（例えば、 $Ca^{2+}$  チャンネルが阻害されると再分極時間は短縮する。薬物の中には両チャンネルを阻害するような薬物もある）ことから、*in vitro* 試験の  $I_{kr}$  チャンネルアッセイ法だけでは検出系として不十分である。そこで、*in vivo* 再分極アッセイ法である麻酔モルモットの心室再分極アッセイ法を取り入れたバッテリー試験の有用性を検討した。その結果、hERG 試験及び麻酔モルモット *in vivo* 再分極アッセイ法とも cisapride 及び mitemincinal の QT 延長作用を精度よく検出することができ、バッテリー試験法としての本試験系の有用性を立証した。

## 第2章 ハイリスク患者モデルとしての催不整脈モデル動物の有用性

第1章で QT 延長作用を示す薬物の有用な評価系は確立したものの、ヒトにおいて TdP を引き起こすかどうかを QT 延長作用の結果だけから予測することは難しい。なぜならば、TdP 発生が心臓にリスクを持った患者に多いように、QT 延長作用の強弱だけでは精度よく TdP 作用をもつ薬物を検出することは困難である。そこで、著者はヒトでの TdP 発生リスクを予測するためには、ハイリスク患者を想定した催不整脈モデル動物、すなわち、ウサギ催不整脈モデル ( $\alpha_1$  受容体作動薬 methoxamine の静脈内持続投与) の利用が重要と考え、その評価系としての有用性について、cisapride と mitemincinal を用いて検討した。その結果、cisapride は明らかな QT 延長作用を示すと共に、TdP の発生が6例中3例に認められた。一方、mitemincinal では QT 延長作用が認められたものの、TdP は6例中まったく観察されなかった。このことは、cisapride がヒトの臨床現場において TdP を引き起こすこと、及び mitemincinal が臨床試験において TdP を引き起こしていないことをよく反映しており、このモデルは極めて有用であることを証明した。さらに、この研究成果は、TdP 発生の要因が QT 延長作用のみではないことを示唆しており、これまで QT 延長作用の有無のみで判断してきたリスク評価に、TdP 発生リスクの評価を

加えることの重要性を証明した。

### 第3章 麻酔犬における TRP 測定の有用性

第2章でウサギ催不整脈モデル ( $\alpha_1$  受容体作動薬 methoxamine の静脈内持続投与) の有用性を証明したものの、 $\alpha_1$  受容体遮断作用を合わせ持つような薬物では、この試験系 (TdP 発生有無) の検出力は低下してくると考えられる。また、ヒトにおける薬物の QT 延長作用及び TdP 発生を予測するためには、よりヒトに近い心拍数を持つ動物で検討する必要がある。なぜなら、心拍数が早ければ早い (頻脈であればある) ほど QT 延長作用の効果を減弱する逆頻度依存性が認められるからである。そこで、実験動物の中でよりヒトに近い心拍数を持つイヌを用いた試験系が必要となる。また、その試験系には TdP 発生の有無を検出できることも求められる。TdP を引き起こす薬物の多くは再分極過程のうち、活動電位終末相 (TRP、不応期終了から再分極過程の終了まで) を延長させることが知られているので、TRP の延長が TdP 発生の指標になるか否かを検討した。すなわち、第1章及び第2章で証明された cisapride (QT 延長と TdP 発生) と mitemcinal (QT 延長は認められるが、TdP 発生は認められない) を用いて検証した。

その結果、イヌをハロセン麻酔下に置くことで、イヌの心拍数をよりヒトに近い状況にコントロールすることができ、結果として、cisapride では TRP の延長が観察され、mitemcinal では TPR の延長が観察されなかった。このことは、ハロセン麻酔下のイヌで TRP を指標とする試験系では TdP 発生の有無を検出できることを意味している。このように麻酔イヌでの TRP 測定は極めて有用であり、致死性不整脈リスク評価系に加えることの意義を立証した。

第4章では第1～3章で確立、立証、および提案してきた (新しい試験法も含めた) バッテリー試験法の有用性を実際に (最終章として) 証明するために、この評価系の各試験系で TdP 誘発作用及び/あるいは QT 延長作用の認められた血中の遊離型薬物濃度とヒトの臨床使用量の血中遊離型薬物濃度との乖離度を検討している。その結果、mitemcinal では、その乖離度は 100-18,000 倍であるのに対し、cisapride はいずれの (試験系の比較) 場合もわずか 10 倍以内であったことから、臨床使用に際して、cisapride では TdP 発生リスクが高く、mitemcinal では TdP 発生リスクが低いことを証明した。

このように、本研究で確立された致死性不整脈に対する評価系はリスク予測のための体系として極めて有用であることを立証した。また、この研究成果は、トキシコロジーの分野で新たな評価体系の確立として、その価値が極めて高いことが認められ、国際基準である FDA ガイドラインにも活かされる結果となった。

それだからこそ、本研究論文は毒性評価手法の精度向上及びデータの信頼性向上など獣医学、トキシコロジー及び実験動物学の上から社会に大きく貢献するものであり、博士 (獣医学) の学位を授与するのにふさわしい論文と判定した。